



# EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

 Anmeldenummer: 84108441.1

 Int. Cl.<sup>4</sup>: **A 61 K 37/26**


 Anmeldetag: 18.07.84

 Priorität: 22.07.83 DE 3326473

 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
 13.02.85 Patentblatt 85/7

 Benannte Vertragsstaaten:  
 AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

 Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**  
 Postfach 80 03 20  
 D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

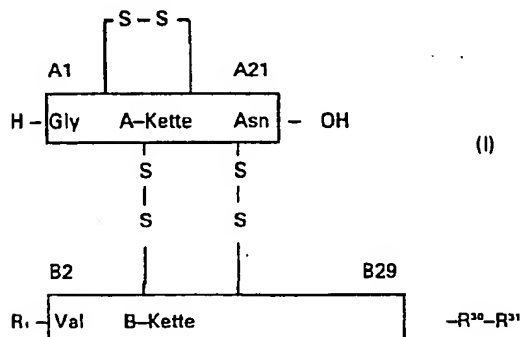
 Erfinder: **Grau, Ulrich, Dr.**  
 Zell 17  
 D-6238 Hofheim am Taunus(DE)

 Pharmazeutisches Mittel zur Behandlung des Diabetes mellitus.

 Die Erfindung betrifft Arzneimittel aus einem physiologisch unbedenklichen Träger und einer Wirkstoffkombination aus

a) einem Insulin-Derivat der Formel I

b) einem Insulin der Formel I, in welcher R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet, R<sup>20</sup> für Ala, Thr oder Ser steht und R<sup>21</sup> OH bedeutet sowie deren Verwendung zur Behandlung des Diabetes mellitus.



In welcher R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet, R<sup>20</sup> für den Rest einer neutralen L-Aminosäure steht und R<sup>21</sup> für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, mit einem Isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5, und

BEST AVAILABLE COPY

Pharmazeutisches Mittel zur Behandlung des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselstörung, die als wesentliches Symptom einen erhöhten Blutzuckerspiegel zeigt. Sie hat ihre Ursache darin, daß das pankreatische Hormon Insulin nicht in genügender Menge freigesetzt wird. Die

5 Substitution des natürlichen Hormons geschieht heute in der Regel durch tierisches Insulin, das aus Schlachttierdrüsen isoliert wird oder humanes Insulin, das semisynthetisch aus Schweineinsulin oder durch gentechnologische Methoden zugänglich ist.

10

Bei der Anwendung gentechnologischer Methoden wurden bisher zwei grundsätzlich verschiedene Wege eingeschlagen: die getrennte Synthese von A- und B-Ketten und deren nachträgliche chemische Rekombination, sowie die Synthese von

15

Präproinsulin, des natürlichen Vorläufers des Insulins. Im Proinsulin-Molekül sind A- und B-Kette durch ein Verbindungsstück, das C-Peptid, verknüpft. Dessen wichtigste Funktion ist nach gegenwärtiger Vorstellung die räumliche Fixierung der beiden Ketten relativ zueinander, so daß eine

20

korrekte Faltung stattfinden kann. Nachdem die Faltung erfolgt ist, werden die drei Disulfidbrücken geknüpft und damit die native dreidimensionale Struktur des Insulins stabilisiert. Die Abspaltung des C-Peptids erfolgt durch Enzyme mit tryptischen und Carboxypeptidase-B-Aktivität. Die Spaltstellen sind durch eine Sequenz Lys-Arg (vor dem N-Terminus der A-Kette) bzw. Arg-Arg (am C-Terminus der B-Kette) vorgegeben. Nur das freie Insulin besitzt volle biologische Aktivität, weil bei Gegenwart des C-Peptids wahrscheinlich ein Teil der biologischen Erkennungsregion an

25

30

der Oberfläche des Moleküls maskiert ist.

Die spezielle chemische Natur des Insulins bringt es mit sich, daß die Therapie in der Regel parenteral erfolgt; das Hormon würde z.B. bei Magen/Darm-Passage vollständig abgebaut, noch bevor es zur Wirkung kommen kann. Abbaureaktionen, im wesentlichen durch verschiedene, relativ unspezifische proteolytische Enzyme, finden aber auch am Injektionsort und in der Zirkulation statt. Die dadurch bedingte kurze Halbwertszeit in vivo von nur etwa 7 Minuten ist physiologisch im Sinne einer Homöostase im Grunde sinnvoll; die Therapie wird dadurch aber erheblich erschwert, weil der Diabetiker typischerweise viermal täglich, in der Regel kurz vor den Mahlzeiten, spritzen muß.

Es hat demgemäß schon frühzeitig Versuche gegeben, dem Insulin eine protrahierte Wirkung zu verleihen. Am erfolgreichsten waren dabei bisher solche Methoden, bei denen durch Zusatz eines Depo-hilfsstoffes das Insulin in eine schwerlösliche Zustandsform überführt wird. Dazu zählen vor allem zweiwertige Zinkionen, in deren Gegenwart das Insulin in neutralem Medium in kristalliner oder amorpher Form vorliegen kann. Der Zusatz von basischen Proteinen, z.B. Protaminsulfat oder Humanglobin, hat, nachdem Insulin ein saures Molekül vom isoelektrischen Punkt  $p_I = 5,4$  ist, den gleichen Effekt: basisches Protein und Insulin liegen im Neutralbereich als kristalliner oder amorpher salzartiger, schwerlöslicher Komplex vor.

Die langsame Freisetzung des Insulins aus diesen Retardzubereitungen erfolgt, wie man sich vorstellt, durch Verdünnung, d.h. Diffusion einzelner, den Kristall oder den amorphen Niederschlag aufbauenden Komponenten oder, im Fall von Insulin-Komplexen mit basischen Proteinen, durch proteolytischen Abbau des Depotträgers.

Neuerdings wird noch humanes Proinsulin, entweder allein oder in Kombination mit den üblichen Depotzusätzen, als

Verzögerungsprinzip diskutiert (s. DE-A-32 32 036). Die Vorstellung ist, daß die proteolytische Abspaltung des C-Peptids in vivo verzögert erfolgt, und damit aus dem an sich biologisch nur wenig aktiven Proinsulin (ca. 1/8 der Aktivität des Insulins, bezogen auf Proteinmenge) das voll aktive Hormon freigesetzt wird. Nur solche Proinsuline sind für die Anwendung am Menschen akzeptabel, die in ihrer Sequenz jener des Menschen identisch (davon gibt es offenbar mehrere) oder sehr ähnlich sind. Schweine- oder Rinderproinsulin sind, wie allgemein bekannt, immunogen. Die exakte Wirkungsweise des Proinsulins bleibt derzeit jedoch noch offen. Es gilt keineswegs als erwiesen, daß spezifisch Insulin freigesetzt wird. Im Gegenteil, der Abbau in vivo wird in vielfältiger Weise unter Produktion zumeist inaktiver Bruchstücke erfolgen. Der therapeutische Nutzen des Proinsulins könnte also vielmehr, wenn überhaupt, auf der Rezeptorebene zu suchen sein.

Nun ist die Diabetestherapie gekennzeichnet von individuellen Einflußfaktoren, wie Unterschiede in der Verwertbarkeit der Mahlzeiten, Unterschiede in der Charakteristik des Unterhautgewebes, daneben aber auch die spezifischen Eßgewohnheiten, körperliche Aktivitäten und viele mehr. Es ist somit unabdingbar für eine gute Blutzuckereinstellung, eine Reihe von Insulinpräparaten mit unterschiedlicher Wirkungscharakteristik zur Verfügung zu haben, die den individuellen Bedürfnissen angepaßt sind. Im Zusammenhang mit nicht- optimaler Einstellung werden neben den unmittelbaren subjektiven und objektiven Effekten, wie Hyper- oder Hypoglykämien insbesondere der Formenkreis der diabetischen Spätschäden, diskutiert. Dazu zählen vor allem Makro- und Mikroangiopathie, Neuropathie, Nephropathie und Retinopathie.

Als Präparationen, die den Bedürfnissen der Patienten optimal angepaßt sind, haben sich neben reinen Verzögerungs-

- insulinen vor allem sogenannte Intermediärinsuline erwiesen. Sie stellen Mischungen aus einer verzögert und einer sofort und kurz wirksamen Komponente dar. Solche Mischungen stellen i.a. komplizierte Mehrphasensysteme dar, die über lange Zeit
- 5 hinweg nur in relativ eng begrenzten Mischungsverhältnissen stabil bleiben. So ist beispielsweise eine Suspension von 2-Zink-Insulinkristallen vom Schwein nicht frei mischbar mit gelöstem Schweineinsulin. Sofort oder im Lauf der Zeit fällt das zugemischte, gelöste Insulin wegen des relativ hohen
- 10 Zinkgehalts, der zur Stabilisierung der Kristalle nötig ist, aus. Solche Mischungen sind innerhalb enger Grenzen stabil, wenn als gelöstes Insulin Rinderinsulin (hiermit wird jedoch die Speziesreinheit, eine medizinisch erwünschte Eigenschaft, eingebüßt) oder eine Mischung aus gelöstem Schweine-
- 15 insulin und des Phenylalanin(B1)-Schweineinsulin verwendet wird (DE-A-24 18 218 und DE-A-24 59 515). Vorteilhafter hinsichtlich der Mischbarkeit mit gelöstem Insulin sind Protamin-Insulin-Zubereitungen, wenn als Verzögerungskomponente Kristalle aus Protamin und Insulin im isophanen
- 20 Verhältnis eingesetzt werden. Mit diesen Präparaten sind NPH-typische Wirkprofile herstellbar; die Gegenwart des Protaminsulfats als körperfremdes, jedoch relativ unbedenkliches Protein als Zusatz erscheint vertretbar.
- 25 Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines stabilen pharmazeutischen Mittels, das eine den individuellen Bedürfnissen des Diabetikers angepaßte Wirkungscharakteristik aufweist.
- 30 Diese Aufgabe wurde nun erfindungsgemäß gelöst durch eine

5

Wirkstoffkombination aus einem Insulin-Derivat, dessen B-Kette C-terminal eine organische Gruppe basischen Charakters trägt, und einem nativen Insulin bzw. seinem Des-Phe<sup>B31</sup>-Analogen.

5

Insulin-Derivate, die am C-terminalen Ende der B-Kette die Reste Arg-OH oder Arg-Arg-OH tragen wurden schon beschrieben. Bekanntlich entstehen diese Derivate bei der enzymatischen Umwandlung von Proinsulin in Insulin in vivo als natürliche Zwischenprodukte und sind auch in kleinen Anteilen in Pankreasextrakten nachweisbar. Die genannten Reste werden normalerweise durch Trypsin und/oder Carboxypeptidase B oder Enzyme mit ähnlicher Spezifität unter Freisetzung des nativen Insulins abgespalten.

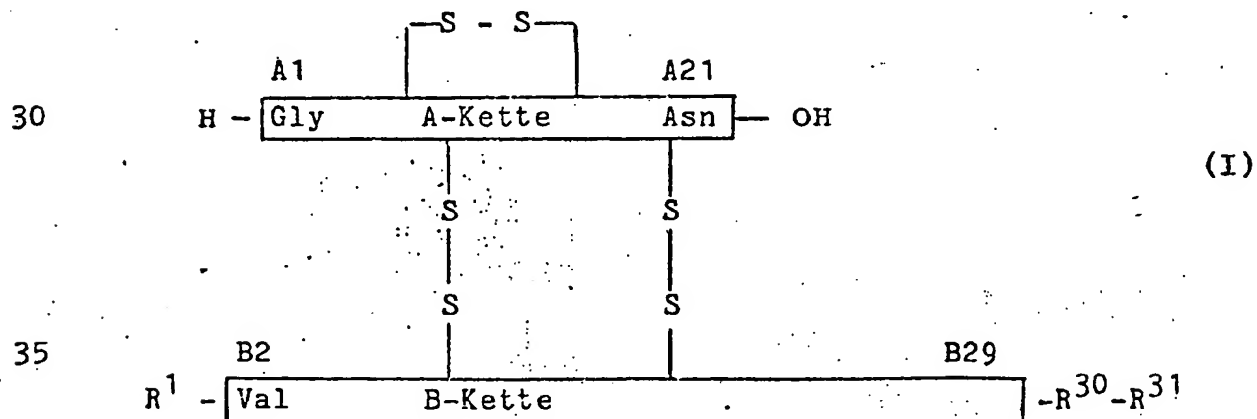
15

Weitere dieser C-terminal basisch modifizierten Insulin-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung sind Gegenstand der deutschen Patentanmeldung P ..... (HOE 83/F 141).

20

Die Erfindung betrifft Arzneimittel aus einem physiologisch unbedenklichen Träger und einer Wirkstoffkombination, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie als Wirkstoffkombination

25 a) ein Insulin-Derivat der Formel I,



in welcher

$R^1$  H oder H-Phe bedeutet,

$R^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch codierbaren L-Aminosäure steht und

5  $R^{31}$  für eine physiologisch verträgliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxyfunktion frei, als Esterfunktion, als  
10 Amidfunktion, als Lacton oder zu  $CH_2OH$  reduziert vorliegen kann,

mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5, und

15 b) ein Insulin der Formel I, in welcher

$R^1$  H oder H-Phe bedeutet,

$R^{30}$  für Ala, Thr oder Ser steht und

20  $R^{31}$  OH bedeutet,

oder physiologisch unbedenkliche Salze davon, sowie ggf. Proinsulin und ggf. C-Peptid enthält.

Bevorzugt sind solche, die dadurch gekennzeichnet sind, daß  
25 in dem unter a) genannten Insulin-Derivat der Formel I

$R^{31}$  für einen Rest der Formel  $-X_n-S$  steht, in welchem

$n = 0, 1, 2$  oder  $3$  ist,

30 X für gleiche oder verschiedene Reste natürlich vorkommender neutraler oder basischer L-Aminosäuren (vorzugsweise basischer L-Aminosäure, insbesondere Arg, Lys, His oder Orn) und/oder der diesen entsprechenden D-Aminosäuren steht und

35 S OH oder eine physiologisch verträgliche, die Carboxygruppe blockierende Gruppe bedeutet, die, falls  $n = 0$  ist, einen positiv geladenen oder protonierbaren

basischen Rest trägt oder, falls n 0 ist, einen solchen Rest tragen kann und worin der C-Terminus

- 5       -X-S   auch für den Rest einer zum entsprechenden Alkohol  
reduzierten Aminosäure oder, im Falle n = 2 oder 3,  
für den Homoserinlacton-Rest stehen kann.

10   Insulin-Derivate der Formel I, die in Position B1 Phenyl-  
alanin tragen, sind besonders bevorzugt. Weiterhin sind  
solche bevorzugt, die in der Position B30 Ala, Thr oder Ser  
aufweisen. Ihre A-Kette und die Kette (B 2-29) weist zweck-  
mäßigerweise die Sequenzen des Rinder- oder Schweineinsulins,  
insbesondere aber die des Humaninsulins auf.

15   Die Aminosäurereste X und Reste der entsprechenden Derivate  
können unabhängig voneinander in der D- oder L-Konfiguration  
vorliegen. Bevorzugt ist jedoch die L-Konfiguration aller  
Reste.

20   Genetisch kodierbar sind die folgenden L-Aminosäuren: Gly,  
Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met,  
Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro (neutrale Aminosäuren  
unterstrichen).

25   Unter einer neutralen, natürlich vorkommenden Aminosäure  
versteht man insbesondere Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile,  
Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe, Pro oder Hyp. Unter einer  
basischen, natürlich vorkommenden Aminosäure versteht man  
insbesondere Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit oder His.

30   Unter Gruppen, die gegebenenfalls eine freie Carboxyfunktion  
am C-terminalen Ende der B-Kette in den erfindungsgemäßen  
Insulin-Derivaten blockieren, versteht man vor allem Ester-  
und Amidgruppen, vorzugsweise (C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-Alkoxy, (C<sub>3</sub>  
35   bis C<sub>6</sub>)-Cycloalkyloxy, NH<sub>2</sub>, (C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-Alkylamino  
oder Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino ,

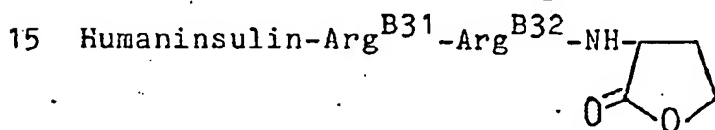
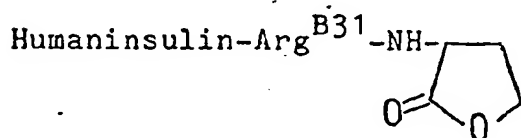


- oder basische Gruppen, wie Amino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>)-Alkylamino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Tri-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>alkyl)-ammonio-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>) alkoxy, Amino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino, 5 (C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-Alkylamino)-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino, [Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylamino]/-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino oder [Tri(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>alkylammonio)]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino, insbesondere -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub>, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>3</sub>, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> oder -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>3</sub>, worin p = 2 10 bis 6 ist und R gleich oder verschieden ist und für Wasserstoff oder (C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-Alkyl steht.

Aus der Reihe der erfindungsgemäßen Insulin-Derivate der Formel I seien beispielsweise die nachstehenden Verbindungen 15 erwähnt, ohne die Erfindung auf diese zu beschränken:

- Humaninsulin - Arg<sup>B31</sup>-OH  
 Schweineinsulin- Arg<sup>B31</sup>-OH  
 Rinderinsulin - Arg<sup>B31</sup>-OH  
 20 Humaninsulin - Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Schweineinsulin- Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Rinderinsulin - Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Des-Phe<sup>B1</sup>-Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-OH  
 Des-Phe<sup>B1</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-OH  
 25 Des-Phe<sup>B1</sup>-Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Des-Phe<sup>B1</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-OCH<sub>3</sub>  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-OCH<sub>3</sub>  
 Rinderinsulin-Arg<sup>B31</sup>-OCH<sub>3</sub>  
 30 Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OCH<sub>3</sub>  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OCH<sub>3</sub>  
 Des-Thr<sup>B30</sup>-Humaninsulin-Val<sup>B30</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OCH<sub>3</sub>  
 Des-Thr<sup>B30</sup>-Humaninsulin-Val<sup>B30</sup>-Arg<sup>B31</sup>-OH  
 Des-Thr<sup>B30</sup>-Humaninsulin-Val<sup>B30</sup>-Ala<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 35 Humaninsulin-Lys<sup>B31</sup>-OH

- Humaninsulin-D-Arg<sup>B31</sup>-OH  
 Humaninsulin-D-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-D-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Humaninsulin-Lys<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 5 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Lys<sup>B32</sup>-OH  
 Humaninsulin-Argininol<sup>B31</sup>  
 Humaninsulin-Val<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Humaninsulin-Val<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-Arg<sup>B33</sup>-OH  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Argininol<sup>B32</sup>  
 10 Humaninsulin-Lys<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-Arg<sup>B33</sup>-OH

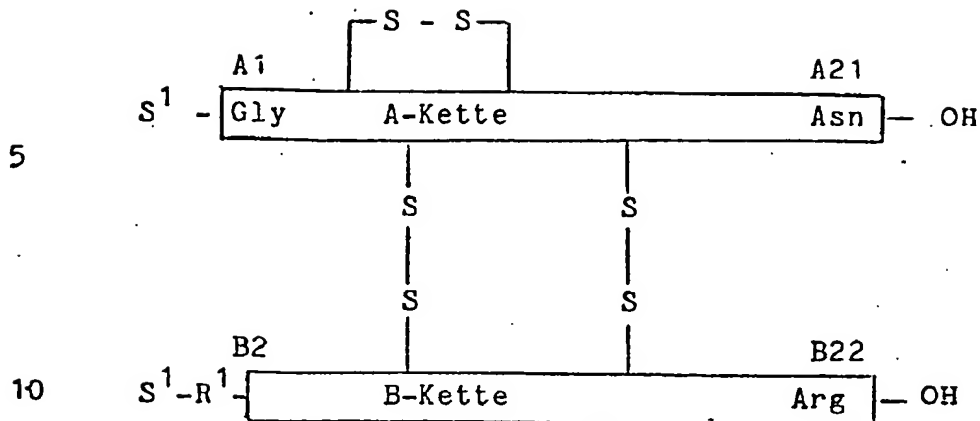


- Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-NH<sub>2</sub>  
 20 Humaninsulin-Orn<sup>B31</sup>-OH  
 Humaninsulin-Leu<sup>B31</sup>-Cit<sup>B32</sup>-OH  
 Humaninsulin-(B30)-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-(B30)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
 25 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-(B30)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>  
 Humaninsulin-(B30)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>  
 Humaninsulin-Leu<sup>B31</sup>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>  
 Humaninsulin-Trp<sup>B31</sup>-Trp<sup>B32</sup>-Trp<sup>B33</sup>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-N<sup>+</sup>(nC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>

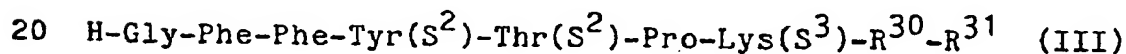
30

Die Herstellung der Insulin-Derivate der Formel I erfolgt dadurch, daß man

a) ein Des-Octapeptid (B 23-30)-Insulin der Formel II,



in der  $R^1$  Phe oder eine Bindung und  $S^1$  eine protonen-  
 solvolytisch oder durch  $\beta$ -Eliminierung abspaltbare  
 15 Aminoschutzgruppe wie den tert-Butyloxycarbonyl-(Boc),  
 den tert-Amyloxycarbonyl-(Aoc) oder den Methylsulfonyl-  
 ethyloxycarbonyl-(Msc)-rest bedeuten, kondensiert mit  
 einem Peptid der Formel III



in welcher  $R^{30}$  und  $R^{31}$  oben definierten Bedeutungen  
 haben,  $S^2$  für Wasserstoff, Bzl oder  $Bu^t$  und  $S^3$  für  
 eine Urethanschutzgruppe, wie Boc, Moc oder Z stehen,  
 25 wobei an den Resten  $R^{30}$  und  $R^{31}$  gegebenenfalls  
 vorhandene freie  $\text{COOH-}$ ,  $\text{OH-}$ ,  $\text{SH-}$ ,  $\omega\text{-NH}_2\text{-}$ , Guanidino-  
 und/oder Imidazol-Gruppen, falls erforderlich, in an sich  
 bekannter Weise geschützt vorliegen, und gegebenenfalls  
 vorhandene Schutzgruppen in an sich bekannter Weise  
 30 abspaltet,

b) ein Des-B30-Insulin der Formel I, in welcher  $R^1$  für H  
 oder H-Phe und der C-Terminus  $R^{30}\text{-R}^{31}$  zusammen für OH  
 stehen, in Gegenwart von Trypsin oder einer trypsinähn-  
 35 lichen endo-Peptidase umgesetzt mit einer Verbindung der  
 Formel IV

in der R<sup>30</sup> und R<sup>31</sup> die oben definierten Bedeutungen haben und worin vorhandene freie COOH-, OH-, SH, ω-  
5 -NH<sub>2</sub>-, Guanidino und/oder Imidazoe-Funktionen, falls erforderlich, in an sich bekannter Weise geschützt vorliegen und anschließend gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen in an sich bekannter Weise abspaltet oder

10

c) zur Herstellung eines Insulin-Derivats mit L-konfigurier-  
ten Aminosäureresten im Rest R<sup>31</sup> ein Proinsulin,  
Proinsulinanaloges oder Präproinsulinanaloges oder ein  
15 Intermediat dieser Verbindungen chemisch und/oder enzyma-  
tisch spaltet.

Die bei der Verfahrensvariante b) als Ausgangsverbindungen  
verwendeten Des-B30-Insuline sind beispielsweise aus der  
EP-A-46 979 oder Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359 (1978)  
20 799 bekannt. Das bei Variante b) verwendete Ausgangsmaterial  
der Formel IV wird in an sich bekannter Weise nach den  
Methoden der Peptidchemie hergestellt. Brauchbare Schutz-  
gruppen für IV sind detailliert beschrieben bei M. Bodanzky  
et al., Peptide Synthesis, 2nd Ed. 1976, Wiley & Sons.

25

Durch gentechnologische Methoden sind inzwischen humanes  
oder Primaten-Proinsulin als Ausgangsmaterial für die  
Verfahrensvariante c) zugänglich: Die Derivate Arg(B31) und  
Di-Arg(B31-32) sind daraus durch einfache Verdauung mit  
30 Trypsin oder trypsin-ähnlichen Enzymen zugänglich. Daneben  
lassen sich aber auch relativ einfach Plasmide konstruieren,  
die zu neuen Insulinderivaten führen, weil sie an Stelle der  
natürlich an B31 oder B32 befindlichen Arginine andere  
neutrale oder basische Aminosäuren codieren.

Die Herstellung von Proinsulin unter Anwendung der Rekombinations-DNA-Methodologie erfordert die Bildung einer DNA-Sequenz die für die Aminosäuresequenz eines Proinsulins codiert, was sich entweder durch Isolierung, Konstruktion oder eine Kombination aus beidem erreichen läßt. Die Proinsulin-DNA wird dann in Lese-Phase in einen geeigneten Clonierungs- und Expressionsträger eingesetzt. Der Träger dient zur Transformierung eines geeigneten Mikroorganismus, und der hierbei erhaltene transformierte Mikroorganismus wird dann Fermentationsbedingungen unterzogen, die zur Bildung weiterer Kopien des proinsulinhaltigen Vektors und zur Expression von Proinsulin eines Proinsulinderivats oder einem Proinsulinvorläufer bzw. einem Präproinsulinderivat führen.

Handelt es sich beim Expressionsprodukt um einen Proinsulinvorläufer, dann enthält ein solches Produkt im allgemeinen die Proinsulinaminosäuresequenz, die an ihrer endständigen Aminogruppe an ein Bruchstück eines Proteins gebunden ist, das normalerweise durch die Gensequenz ausgedrückt wird, bei welcher das Proinsulin oder Proinsulinderivat eingesetzt worden ist. Die Proinsulinaminosäuresequenz ist an das Proteinbruchstück über eine spezifisch spaltbare Stelle gebunden, bei der es sich beispielsweise um Methionin handelt.

Die erhaltene Proinsulinaminosäuresequenz wird vom verschmolzenen Genprodukt, beispielsweise wie in der DE-A-32 32 036 beschrieben, abgespalten und das Proinsulin nach Reinigung isoliert.

Die enzymatische Spaltung des auf diese Weise erhaltenen Proinsulins oder Proinsulinderivats erfolgt in Analogie zu der in Excerpta Medica International Congress Series No. 231, Seite 292 ff. oder der in der deutschen Patentanmeldung P 32 09 184 (HOE 82/F 047) beschriebenen Verfahrensweise.

Mit Hilfe der beschriebenen semisynthetischen Verfahren sind damit zusätzlich zu den bekannten Arginin(B30)- und Diarginin(B31-32)-Derivaten sowie jenen durch gentechnologischen Methoden zugänglichen Derivaten, die an R<sup>31</sup> natürliche L-Aminosäuren tragen, eine Reihe von neuen Insulin-Derivaten zugänglich, die als Charakteristikum eine oder mehrere basische Gruppen und/oder die Abwesenheit der freien Carboxylgruppe aufweisen, so daß die Nettoladung des Moleküls um mindestens eine positive Ladung gegenüber nativem Insulin oder gegenüber Des-Phe<sup>B1</sup>-Insulin zunimmt.

- 10 Dazu gehören z.B. Derivate, die an Position B-31 statt der natürlichen Aminosäuren L-Lysin, L-Histidin oder L-Arginin, deren D-Enantiomere oder gängige D- oder L-Aminosäureanaloge, die in der Seitenkette eine basische Gruppierung (z.B. Ornithin, Hydroxylysin ) tragen, aufweisen. Statt einer
- 15 Aminosäure kann an Stelle der Position B31 beispielsweise die Cholinestergruppe treten, wodurch netto zwei Positiveladungen gewonnen werden. Die Aminosäure oder das Aminosäureanalogon an Position B31 kann ein freies Carboxylende aufweisen oder mit einfachen Alkoholen (z.B. Methanol,
- 20 Ethanol) verestert bzw. mit einfachen Stickstoffbasen (z.B. Ammoniak, Mono- oder Di- methylamin) amidiert sein; sie kann daneben z.B. mit Cholin verestert sein. An Position B31 kann beispielsweise eine neutrale oder auch eine weitere natürliche basische Aminosäure oder eines der oben beschriebenen
- 25 Aminosäurederivate folgen; in analoger Weise kann deren Carboxylgruppe frei oder verestert bzw. amidiert sein. Es kann beispielsweise auch hier die Cholinestergruppe bzw. noch eine weitere neutrale oder basische Aminosäure bzw. ein Aminosäureanalogon folgen.

30

Allen diesen Insulinderivaten ist gemeinsam, daß die zusätzliche(n), an der Oberfläche des Moleküls befindliche(n) positive(n) Ladung(en) dem Molekül einen in den Neutralbereich hinein verschobenen isoelektrischen Punkt verleihen.

- 35 Je nach Derivat werden isoelektrische Punkte von 5,8 bis

8,5, insbesondere 6,2 bis 8,2 in der isoelektrischen Fokussierung gemessen. Damit sind die Derivate im Neutralbereich weniger löslich als natives Insulin oder Proinsulin, die ihren isoelektrischen Punkt und damit den Bereich maximaler Unlöslichkeit bei pH= 5,4 haben, während sie im Neutralbereich normalerweise gelöst vorliegen.

Demzufolge stellen diese Insulin-Derivate der Formel I vollkommen neue Verzögerungsprinzipien dar, die ohne Depot-Hilfsstoffe, wie Zink oder Protaminsulfat, zur Wirkung gebracht werden können. Die Depotwirkung geht auf ein inhärentes, proteinchemisch bedingtes, physikalisches Prinzip, die Schwerlöslichkeit am isoelektrischen Punkt, zurück. Die Wiederauflösung unter physiologischen Bedingungen sollte, wie man annehmen wird, durch Abspaltung der zusätzlichen basischen Gruppen erreicht werden, die je nach Derivat durch tryptische oder trypsin-ähnliche, und/oder Carboxypeptidase B- oder Carboxypeptidase B-ähnliche und/oder Esterase-Aktivität zustande kommt. Die jeweils abgespaltenen Gruppen sind entweder rein physiologische Metaboliten, wie Aminosäuren, Ornithin oder Cholin, oder aber physiologisch unbedenkliche und leicht metabolisierbare Substanzen.

Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-OH und das entsprechende Diarginin-Derivat weisen den Untersuchungen von Chance, Excerpta Medica International Congress Series No. 231, Seite 292, 293 zufolge nur 62 % bzw. 66 % der Aktivität des nativen Schweineinsulins auf.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß (auch im Unterschied zu Proinsulin) die biologische Aktivität der Derivate etwa gleich hoch ist wie die von nativem Insulin. Sie sind auch im Unterschied zu in der Literatur beschriebenen Intermediaten, die noch Teile des heterologen C-Peptids enthalten, nicht stärker immunogen als das entsprechende

Insulin selbst. Möglicherweise haben die oben genannten, zu niedrigen Werte von Chance ihre Ursache darin, daß diese Peptide nicht rein vorgelegen haben oder daß die Messung mit einem systematischen Fehler behaftet war.

5

Neben der Anwendung der beschriebenen Derivate allein oder in Mischung als reine Verzögerungsinsuline oder in Kombination mit den bekannten Depotträgern ist es nun möglich, in vielfältiger Weise stabile Mischungen mit schnell zur

10

Verfügung stehendem Insulin, z.B. gelösten Anteilen, herzustellen. Es ist damit eine Palette von sehr fein abgestimmten Wirkprofilen zugänglich.

15

Besonders in Frage kommen neutrale Mischungen aus einem oder mehreren Derivaten, die als Retard-Komponente wirken, mit gelöstem, nativem Insulin, bevorzugt der gleichen Spezies.

Daneben können aber auch Proinsulin und/oder C-Peptid, jeweils allein oder in Kombination mit Insulin als gelöste Komponente eingesetzt werden. Charakteristisch für diese

20

Zubereitungen ist, daß sie in jedem Mischungsverhältnis stabil sind. Dies ist Voraussetzung für die Herstellung der heute in der Therapie sehr gebräuchlichen, intermediär wirksamen Insulinpräparate.

25

Die erfindungsgemäßen Mittel können auch mehrere verschiedene Insulin-Derivate der Formel I und/oder mehrere verschiedene Insuline der Formel I enthalten. Darüberhinaus können auch andere therapeutisch interessante Kombinationen zur Anwendung kommen, wie etwa die Mischung von Derivat und

30

Insulin und/oder Proinsulin und/oder Des-Phe<sup>B1</sup>-Insulin und/oder C-Peptid in gelöster Form oder in Form von NPH-Kristallen oder anderen klassischen Verzögerungsformen. Auf diese Weise lassen sich u.a. sehr lang wirksame Präparate mit differenziertem Basalprofil herstellen. Gerade beim

35

Humaninsulin wäre dies wünschenswert, da nach den bisherigen Erfahrungen dessen Wirkungsdauer weder in Form der Zink-



kristalle noch in Form der NPH-Kristalle ein echtes Ultra-Retard-Profil, wie etwa die analogen Rinderinsulinpräparate, aufweist.

- 5 Insulin und/oder Proinsulin und/oder Des-Phe<sup>B1</sup>-Insulin und/oder C-Peptid und Insulin-Derivat der Formel I können auch in Form eines Alkalisalzes oder des Ammoniumsalzes eingesetzt werden.
- 10 Die Mischungsverhältnisse zwischen nativem Insulin und/oder Proinsulin und/oder Des-Phe<sup>B1</sup>-Insulin und/oder C-Peptid und Insulinderivat können sich im Bereich 0 bis 99 Prozent Insulin und 0 bis 99 Prozent Proinsulin und 0-99 Prozent des Phenylalanin-(B1)-Insulin und 0-99 Prozent C-Peptid und 1
- 15 bis 100 Prozent Insulinderivat (bezogen auf die Gesamtmenge an diesen Peptiden) bewegen.

Eine erfindungsgemäße Anwendungsform ist auch eine saure Lösung z.B. von Insulin-Derivat und Insulin oder Proinsulin,

20 die einen pH unterhalb des isoelektrischen Punktes des Insulins aufweist.

Bevorzugte Mittel weisen einen pH-Wert zwischen 2,5 und 8,5 auf und liegen dabei als Lösung oder Suspension vor.

25

Typischerweise werden die beschriebenen Anwendungsformen in einem wäßrigen Medium gelöst bzw. suspendiert sein, welches zusätzlich ein geeignetes Isotoniemittel, z.B. Glycerin oder Kochsalz und ein geeignetes Mittel gegen mikrobiellen

- 30 Befall, z.B. Phenol, m-Kresol oder p-Hydroxybenzoesäure-ester, in geeigneter Dosierung enthält. Dieser physiologisch unbedenkliche Träger kann im pH-Bereich von 5,0 und 8,5 zusätzlich eine Puffersubstanz, z.B. Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumphosphat oder Tris-(hydroxymethyl)-amino-
- 35 methan, enthalten. Zum Lösen und zum Einstellen des pH-

Wertes werden verdünnte Säuren, typischerweise Salzsäure, oder verdünnte Laugen, typischerweise Natronlauge, verwendet.

- 5 Insulinanteil und/oder Proinsulinanteil und/oder desPhe<sup>B1</sup>-  
Insulinanteil und/oder C-Peptidanteil und Anteil des  
Insulin-Derivats der Formel I können unabhängig voneinander  
jeweils in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form  
vorliegen. Jeweils ein beliebiger Teil des Insulinanteils  
10 und/oder Proinsulinanteils und/oder desPhe-Insulinanteils  
und/oder C-Peptidanteils und des Anteils des Insulin-Derivates der  
Formel I kann in kristalliner Form, jeweils ein weiterer  
beliebiger Teil des Insulinanteils und/oder Proinsulinan-  
teils und/oder desPhe-Insulinanteils und/oder C-Peptidan-  
15 teils und des Anteils des Insulin-Derivats der Formel I in  
amorpher Form sowie jeweils der Rest des Insulinanteils  
und/oder Proinsulinanteils und/oder desPhe-Insulinanteils und/oder  
C-Peptidanteils und des Anteils des Insulin-Derivats der  
Formel I in gelöster Form vorliegen.

20

Die Zubereitung kann in geeigneten Mengen Hilfsmittel mit verzögernder Wirkung (Depot-Hilfsmittel) wie etwa Protaminsulfat, Globin oder Zink (0 bis 100 µg / 100 I.U.) enthalten.

- 25 Dieses Verzögerungsprinzip kann in Kombination mit dem  
gesamten Wirkstoffanteil oder Teilen davon angewandt werden.  
Auch können mehrere verschiedene verzögernd wirkende Hilfs-  
stoffe enthalten sein.

- 30 Es ist manchmal vorteilhaft, der erfindungsgemäßen Zube-  
reitung eine geeignete Menge eines geeigneten Stabilisators  
zuzusetzen, der die Präzipitation von Protein bei thermisch-  
mechanischer Belastung bei Kontakt mit verschiedenen  
Materialien verhindert. Solche Stabilisatoren sind beispiels-  
35 weise aus der EP-A-18609, der DE-A-32 40 177 oder aus der  
WO-83/00288 bekannt.

Zur weiteren Erläuterung der Erfindung sollen die folgenden Beispiele dienen, ohne die Erfindung auf diese zu beschränken.

Beispiel 1

5

Insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH vom Schwein, hergestellt durch tryptische Verdauung aus Schweine-Proinsulin, in neutraler Formulierung mit 40 IE/ml und dessen Mischbarkeit mit 20 % bzw. 40 % gelöstem Schweineinsulin (40 IE/ml):

10

Man löst in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

Insulin-Arg <sup>B31</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH vom Schwein (27,0 IE/mg)	14,8 mg
15 Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	21,0 mg
Glycerin	160,0 mg
Phenol	6,0 mg
m-Kresol	15,0 mg

- 20 Der pH wird durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH = 7,3 eingestellt. Eine Lösung von Schweineinsulin von 40 IE/ml in einem ähnlichen oder dem gleichen Medium wird zugemischt, so daß dessen volumenmäßiger Anteil 20 % bzw. 40 % beträgt. Mit Hilfe der HPLC wird jeweils sofort und nach 3  
25 Monaten Lagerung bei 4°C der Gesamt-Gehalt sowie der Gehalt im Überstand ermittelt.

	Gesamt-Bestimmung		Überstand	
	t = 0	3 Monate	t = 0	3 Monate
30	4°C		4°C	
20 %	40 IE/ml	40 IE/ml	7,5 IE/ml	7,8 IE/ml
40 %	40 IE/ml	40 IE/ml	16,2 IE/ml	15,6 IE/ml

- 35 Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH trennt sich auf der HPLC von Schweineinsulin ab. Im Überstand ist kein Derivat

nachweisbar, d.h. der unlösliche Anteil wird nicht aufgelöst. Umgekehrt ist nach Waschen des Niederschlages kein Insulin nachweisbar, d.h. Insulin fällt auch nicht aus.

5 Beispiel 2

Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-OH, hergestellt durch tryptische Verdauung aus Schweine-Proinsulin, in Mischung mit 25 % (Aktivität) gelöstem Schweineproinsulin in neutraler Formulierung mit 40 IE/ml und dessen Depot-Wirkung:

Man mischt in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

	Schweineinsulin-Arg <sup>B31</sup> -OH	10,9 mg
15	27,5 IE/mg	
	Schweineproinsulin	30,3 mg
	3,3 IE/mg	
	Natriumacetat	14,0 mg
	p-Hydroxybenzoesäuremethylester	10,0 mg
20	Kochsalz	80,0 mg

Durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH wird pH = 7,0 eingestellt.

25 Eine solche Suspension zeigt am Hund eine Depotwirkung, die ähnlich einem Depot-Vergleichspräparat (Optisulin<sup>(R)</sup> Depot CS) ist.

Beispiel 3

30

Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH, hergestellt aus Schweineproinsulin durch tryptische Verdauung, in Form von NPH-Kristallen, in Mischung mit 25 % des-Phenylalanin-(B1)-Schweineinsulin, hergestellt aus Schweineinsulin durch Edmann Abbau, in neutraler Formulierung mit 40 IE/ml und deren verzögerte Wirkung.

35

Man mischt in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

	Schweineinsulin-Arg <sup>B31</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH	11,1 mg
	27,0 IE/mg	
5	des-Phenylalanin-(B1)-Schweineinsulin	3,6 mg
	28,0 IE/mg	
	Protaminsulfat	1,0 mg
	Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	21,0 mg
	Phenol	6,0 mg
10	m-Kresol	16,0 mg
	Glycerin	160,0 mg

Durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH wird pH = 7,3 eingestellt.

15

Eine solche Suspension zeigt am Hund einen depotähnlichen Wirkungsverlauf.

#### Beispiel 4

20

Humaninsulin-(B30)-Cholinester, hergestellt aus Schweineinsulin durch Semisynthese, in Mischung mit 40 % Humaninsulin und 20 % (Masse) Human-C-Peptid, in neutraler Zubereitung mit 40 IE/ml und dessen mittellange Wirkungs-  
25 charakteristik:

Man mischt in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

	Humaninsulin-(B30)-Cholinester	7,2 mg
30	(28 IE/mg)	
	Humaninsulin	7,2 mg
	(28 IE/mg)	
	Human-C-Peptid	3,6 mg
	Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	21,0 mg
35	m-Kresol	27,0 mg
	Glycerin	160,0 mg

Der pH-Wert wird durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH = 7,3 eingestellt.

- 5 Eine solche Suspension zeigt am Hund ein Wirkprofil vergleichbar einem Kombinationspräparat (z.B. Komb-H-Insulin<sup>(R)</sup> Hoechst).

#### Beispiel 5

- 10 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Lys<sup>B32</sup>-OCH<sub>3</sub>, hergestellt durch Semisynthese aus Schweineinsulin, in Mischung mit 50 % Zink-Humaninsulinkristallen in einer Zubereitung mit 40 IE/ml und deren verzögerte Wirkung.

- 15 Man mischt in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

	Humaninsulin-Arg <sup>B31</sup> -Lys <sup>B32</sup> -OCH <sub>3</sub>	7,4 mg
	(27,0 IE/mg) .	
	Humaninsulin	7,4 mg
20	(28 IE/mg)	
	Zinkchlorid, wasserfrei	0,23 mg
	Natriumacetat	14,0 mg
	p-Hydroxybenzoesäuremethylester	10,0 mg
	Kochsalz	80,0 mg

25

Durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH wird pH = 7,0 eingestellt.

- 30 Eine solche Präparation hat am Kaninchen (0,4 IE/kg) eine ausgeprägte Retardwirkung.

#### Beispiel 6

- 35 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-OH in Mischung mit 30 % Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH, beide hergestellt durch tryptische

Verdauung aus Primaten-Präproinsulin exprimiert in E.coli,  
in Mischung mit 40 % kristallinem NPH-Humaninsulin in einer  
Zubereitung mit 40 IE/ml und deren ausgeprägte Retardwirkung.

5 Man mischt in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

	Humaninsulin-Arg <sup>B31</sup> -OH	4,4 mg
	(27,5 IE/mg)	
	Humaninsulin-Arg <sup>B31</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH	4,4 mg
10	(27,0 IE/mg)	
	Humaninsulin	5,7 mg
	(28 IE/mg)	
	Protaminsulfat	0,5 mg
	Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	21,0 mg
15	m-Kresol	15,0 mg
	Phenol	6,0 mg
	Glycerin	160,0 mg

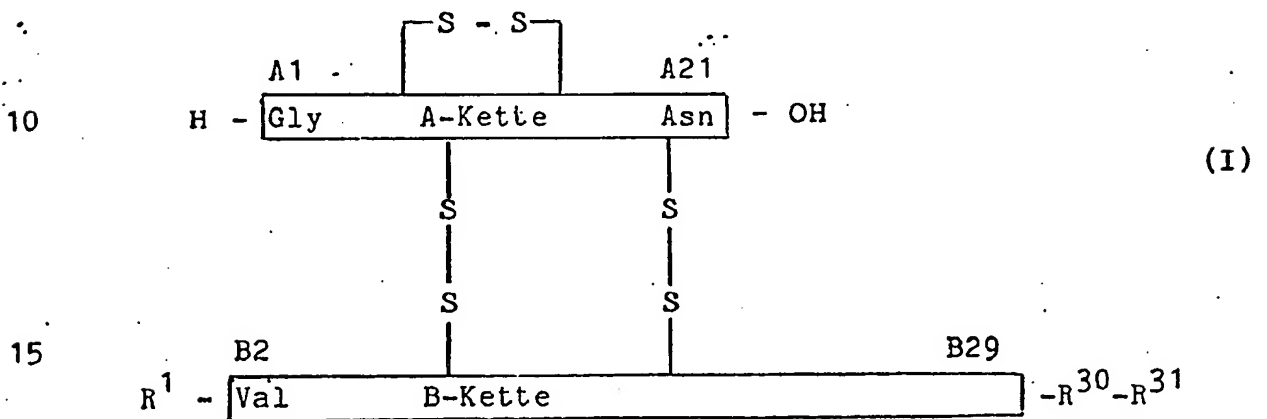
20 Durch Zugabe von 1 N NaOH bzw. 1 N HCl wird pH = 7,3 einge-  
stellt.

Eine solche Suspension zeigt am Kaninchen eine stark ver-  
zögerte und lang anhaltende Wirkung.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Arzneimittel aus einem physiologisch unbedenklichen Träger und einer Wirkstoffkombination, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoffkombination

5 a) ein Insulin-Derivat der Formel I,



in welcher

20  $\text{R}^1$  H oder H-Phe bedeutet,

$\text{R}^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht und

25  $\text{R}^{31}$  für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxyfunktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu  $\text{CH}_2\text{OH}$  reduziert vorliegen kann,

30

mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5, und



b) ein Insulin der Formel I,  
in welcher

$R^1$  H oder H-Phe bedeutet,

5  $R^{30}$  für Ala, Thr oder Ser steht und

$R^{31}$  OH bedeutet,

oder physiologisch unbedenkliche Salzendavon, sowie  
ggf. Proinsulin und ggf. C-Peptid enthält.

10 2. Mittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in  
dem unter a) genannten Insulin-Derivat der Formel I

$R^{31}$  für einen Rest der Formel  $-X_n-S$  steht,  
in welchem

15  $n = 0, 1, 2$  oder  $3$  ist,

X für gleiche oder verschiedene Reste natürlich  
vorkommender neutraler oder basischer L-Amino-  
säuren und/oder der diesen entsprechenden D-Amino-  
säuren steht und

20 S OH oder eine physiologisch unbedenkliche, die  
Carboxygruppe blockierende Gruppe bedeutet, die,  
falls  $n = 0$  ist, einen positiv geladenen oder  
protonierbaren basischen Rest trägt oder, falls  $n$   
0 ist, einen solchen Rest tragen kann und worin  
25 der C-Terminus

$-X-S$  auch für den Rest einer zum entsprechenden  
Alkohol reduzierten Aminosäure oder, im Falle  
30  $n = 2$  oder  $3$ , für den Homoserinlacton-Rest stehen  
kann.

3. Mittel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß im Insulin-Derivat und im Insulin der Formel I  $R^1$   
für H-Phe steht.

35

4. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß in dem unter 1 a) genannten Insulin-Derivat  
der Formel I  $R^{30}$  für Ala, Thr oder Ser steht.

5. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß in dem unter 1a) genannten Insulin-Derivat der Formel I die Aminosäurereste X in der L-Konfiguration vorliegen.
- 5
6. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in dem unter 1a) genannten Insulin-Derivat der Formel I S für OH, (C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-Alkoxy, (C<sub>3</sub> bis C<sub>6</sub>)-Cycloalkyloxy, NH<sub>2</sub>, Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkyl-amino, (C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-Alkylamino, Amino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>)-Alkylamino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Di(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Tri(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkyl-ammonio-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)alkoxy, Amino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamin, [ (C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylamino ]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino, [ Di(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylamino ]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino oder [ Tri-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)alkylammonio ]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkyl-amino steht.
- 10
- 15
- 20 7. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in dem unter 1a) genannten Insulin-Derivat der Formel I X einen Rest einer natürlich vorkommenden basischen Aminosäure, wie Lys, Arg, His, Cit, Orn oder Hyl und/oder deren D-Formen bedeutet.
- 25
8. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es Insulin-B 31-Arg-OH oder Insulin-B 31-Arg-Arg-OH enthält.
- 30 9. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es mehrere verschiedene Insulin-Derivate der Formel I und/oder mehrere verschiedene Insuline der Formel I enthält.
- 35 10. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Proinsulin oder Proinsulin-analoges und/oder humanes C-Peptid enthält.

11. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischungsverhältnisse zwischen nativem Insulin und/oder Proinsulin und/oder desPhe-Insulin und/oder C-Peptid und Insulinderivat sich im Bereich 0 bis 99 Prozent Insulin und 0 bis 99 Prozent Proinsulin und 0-99 Prozent des-Phe<sup>B1</sup>-Insulin und 0-99 Prozent C-Peptid und 1 bis 100 Prozent Insulin-Derivat der Formel I (bezogen auf die Gesamtmenge dieser Peptide) bewegen.
12. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß dieses einen pH zwischen 2,5 und 8,5 aufweist, und dabei als Lösung oder Suspension vorliegt und ein geeignetes Isotonie-Mittel in der üblichen Menge sowie ein geeignetes Konservierungsmittel in geeigneter Menge enthält.
13. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß dieses zusätzlich eine geeignete Menge einer geeigneten Puffersubstanz enthält, wenn der pH-Wert zwischen 5,0 und 8,5 liegt.
14. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Zubereitung eine geeignete Menge eines geeigneten Stabilisators enthält, der die Präzipitation von Protein bei thermisch-mechanischer Belastung bei Kontakt mit verschiedenen Materialien verhindert.
15. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß dieses eine geeignete Menge Zink enthält, die zwischen 0 und 100 µg/100 Einheiten liegen kann.
16. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß Insulin und/oder Proinsulin und/oder desPhe<sup>B1</sup>-Insulin und/oder C-Peptid und Insulin-Derivat der Formel I in Form eines Alkalisalzes oder des Ammoniumsalzes eingesetzt werden.

17. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß Insulinanteil und/oder Proinsulinanteil und/oder desPhe<sup>B1</sup>-Insulinanteil und/oder C-Peptidanteil und Anteil des Insulin-Derivats der Formel I unabhängig voneinander jeweils in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form vorliegen können.
18. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils ein beliebiger Teil des Insulinanteils und/oder Proinsulinanteils und/oder desPhe-Insulinanteils und/oder C-Peptidanteils und Anteil des Insulin-Derivats der Formel I in kristalliner Form, jeweils ein weiterer beliebiger Teil des Insulinanteils und/oder Proinsulinanteils und/oder desPhe-Insulinanteils und/oder C-Peptidanteil und des Anteils des Insulin-Derivats der Formel I in amorpher Form sowie jeweils der Rest des Insulinanteils und/oder Proinsulin und/oder desPhe-Insulinanteils und/oder C-Peptidanteils und des Anteils des Insulin-Derivats der Formel I in gelöster Form vorliegt.
19. Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Zubereitung eines der bekannten Hilfsmittel mit verzögernder Wirkung in geeigneten Mengen, enthält.
20. Mittel gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Verzögerungsprinzip in Kombination mit dem gesamten Wirkstoffanteil oder mit Teilen davon angewandt wird.
21. Mittel gemäß einem der Ansprüche 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß es Insulin und/oder Proinsulin und/oder desPhe-Insulin und/oder C-Peptid und Insulin-

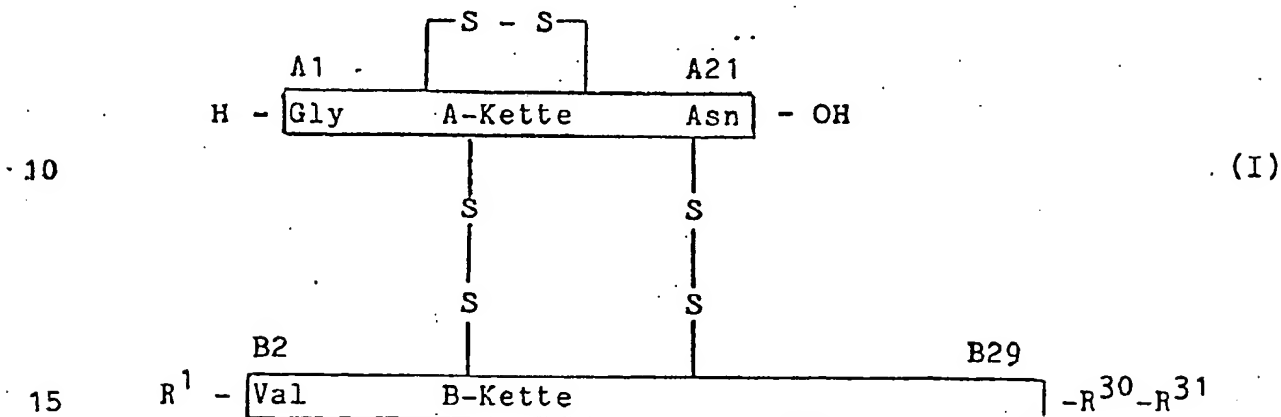
Derivat der Formel I in Kombination mit mehreren verschiedenen verzögernd wirkenden Hilfsstoffen enthält.

22. Verfahren zur Herstellung eines Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man die Wirkstoffkombination in eine geeignete Darreichungsform bringt.
23. Verwendung eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21 zur Behandlung des Diabetes mellitus.

PATENTANSPRÜCHE AT:

1. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels  
aus einem physiologisch unbedenklichen Träger und einer  
Wirkstoffkombination aus

5 a) einem Insulin-Derivat der Formel I



in welcher

$\text{R}^1$  H oder H-Phe bedeutet,

20  $\text{R}^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch kodier-  
baren L-Aminosäure steht und

$\text{R}^{31}$  für eine physiologisch unbedenkliche organische  
Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen  
steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren  
25 beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene  
endständige Carboxyfunktion frei, als Ester-  
funktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu  
CH<sub>2</sub>OH reduziert vorliegen kann,

30 mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5,  
und

b) einem Insulin der Formel I

in welcher

$R^1$  H oder H-PHE bedeutet,

$R^{30}$  für Ala, Thr oder Ser steht und

5  $R^{31}$  OH bedeutet,

oder physiologisch unbedenklichen Salzendavon; sowie

ggf. Proinsulin und ggf. C-Peptid, dadurch gekenn-

zeichnet, daß man diese in eine geeignete Darreichungs-  
form bringt.

10

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
man ein Mittel herstellt, worin in dem unter a) ge-  
nannten Insulin-Derivat der Formel I

15  $R^{31}$  für einen Rest der Formel  $-X_n-S$  steht,

in welchem

$n = 0, 1, 2$  oder  $3$  ist,

X für gleiche oder verschiedene Reste natürlich

vorkommender neutraler oder basischer L-Amino-

20 säuren und/oder der diesen entsprechenden D-Amino-  
säuren steht und

S OH oder eine physiologisch unbedenkliche, die  
Carboxygruppe blockierende Gruppe bedeutet, die,

falls  $n = 0$  ist, einen positiv geladenen oder

25 protonierbaren basischen Rest trägt oder, falls  $n$

0 ist, einen solchen Rest tragen kann und worin

der C-Terminus

-X-S auch für den Rest einer zum entsprechenden

30 Alkohol reduzierten Aminosäure oder, im Falle

$n = 2$  oder  $3$ , für den Homoserinlacton-Rest stehen  
kann.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin im Insulin-Derivat und im Insulin der Formel I  $R^1$  für H-Phe steht.
- 5
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin in dem unter 1 a) genannten Insulin-Derivat der Formel I  $R^{30}$  für Ala, Thr oder Ser steht.
- 10
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin in dem unter 1 a) genannten Insulin-Derivat der Formel I die Aminosäurereste X in der L-Konfiguration vorliegen.
- 15
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin in dem unter 1 a) genannten Insulin-Derivat der Formel I S für OH, ( $C_1$  bis  $C_6$ )-Alkoxy, ( $C_3$  bis  $C_6$ )-Cycloalkyloxy,  $NH_2$ , Di-( $C_1$  bis  $C_6$ )-alkylamino, ( $C_1$  bis  $C_6$ )-Alkylamino, Amino-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkoxy, ( $C_2$  bis  $C_4$ )-Alkylamino-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkoxy, Di( $C_1$  bis  $C_4$ )-alkylamino-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkoxy, Tri( $C_1$  bis  $C_4$ )ammonio-( $C_2$  bis  $C_6$ )alkoxy, Amino-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkylamin,  $[C_1$  bis  $C_4$ )-alkylamino]-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkylamino,  $[Di(C_1$  bis  $C_4$ )-alkylamino]-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkylamino oder  $[Tri-(C_1$  bis  $C_4$ )alkylammonio]-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkylamino steht.
- 20
- 25
- 30
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin in dem unter 1a) genannten Insulin-Derivat der Formel I X einen Rest einer natürlich vorkommenden basischen Aminosäure, wie Lys, Arg, His, Cit, Orn oder Hyl und/oder deren D-Formen bedeutet.
- 35



8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mittel hergestellt wird, welches Insulin-B31-Arg-OH oder Insulin-B31-Arg-Arg-OH enthält.
- 5
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches mehrere verschiedene Insulin-Derivate der Formel I und/oder mehrere verschiedene Insuline der Formel I
- 10 enthält.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches ein Proinsulin oder Proinsulin-analoges und/oder
- 15 humanes C-Peptid enthält.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin die Mischungsverhältnisse zwischen nativem Insulin und/oder Proinsulin und/oder des-Phe-Insulin und/oder
- 20 C-Peptid und Insulinderivat sich im Bereich 0 bis 99 Prozent Insulin und 0 bis 99 Prozent Proinsulin und 0 -99 Prozent des-Phe<sup>B1</sup>-Insulin und 0-99 Prozent C-Peptid und 1 bis 100 Prozent Insulin-Derivat der
- 25 Formel I (bezogen auf die Gesamtmenge dieser Peptide) bewegen.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches
- 30 einen pH zwischen 2,5 und 8,5 aufweist, und dabei als Lösung oder Suspension vorliegt und ein geeignetes Isotonie-Mittel in der üblichen Menge sowie ein geeignetes Konservierungsmittel in geeigneter Menge enthält.

- 5 13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches zusätzlich eine geeignete Menge einer geeigneten Puffer- substanz enthält, wenn der pH-Wert zwischen 5,0 und 8,5 liegt.
- 10 14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches eine geeignete Menge eines geeigneten Stabilisators enthält, der die Präzipitation von Protein bei thermisch-mechanischer Belastung bei Kontakt mit verschiedenen Materialien verhindert.
- 15 15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches eine geeignete Menge Zink enthält, die zwischen 0 und 100 µg/100 Einheiten liegen kann.
- 20 16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin Insulin und/oder Proinsulin und/oder desPhe<sup>B1</sup>-Insulin und/oder C-Peptid und Insulin-Derivat der Formel I in Form eines Alkalisalzes oder des Ammoniumsalzes eingesetzt werden.
- 25 17. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin Insulinanteil und/oder Proinsulinanteil und/oder desPhe<sup>B1</sup>-Insulinanteil und/oder C-Peptidanteil und 30 Anteil des Insulin-Derivats der Formel I unabhängig voneinander jeweils in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form vorliegen können.
- 35 18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin jeweils ein beliebiger Teil des

Insulinanteils und/oder Proinsulinanteils und/oder  
desPhe-Insulinanteils und/oder C-Peptidanteils und Anteil  
des Insulin-Derivats der Formel I in kristalliner Form,  
jeweils ein weiterer beliebiger Teil des Insulinanteils  
5 und/oder Proinsulinanteils und/oder desPhe-Insulinanteils  
und/oder C-Peptidanteil und des Anteils des Insulin-  
Derivats der Formel I in amorpher Form sowie jeweils der  
Rest des Insulinanteils und/oder Proinsulin und/oder  
desPhe-Insulinanteils und/oder C-Peptidanteils und des  
10 Anteils des Insulin-Derivats der Formel I in gelöster  
Form vorliegt.

19.Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch  
gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches  
15 eines der bekannten Hilfsmittel mit verzögernder Wirkung  
in geeigneten Mengen enthält.

20.Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß  
dieses Verzögerungsprinzip in Kombination mit dem ge-  
20 samten Wirkstoffanteil oder mit Teilen davon angewandt  
wird.

21.Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 oder 20, dadurch  
gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches In-  
25 sulin und/oder Proinsulin und/oder desPhe-Insulin und/  
oder C-Peptid und Insulin-Derivat der Formel I in Kombi-  
nation mit mehreren verschiedenen verzögernd wirkenden  
Hilfsstoffen enthält.

0132769

Europäisches  
Patentamt

**EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,**  
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 84108441.1
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.) 4
A	<u>GB - A - 2 104 380</u> (ELI LILLY AND COMPANY)  * Ansprüche; Seite 1, Zeile 35 - Seite 2, Zeile 37 *  --		A 61 K 37/26
A	<u>GB - A - 2 104 382</u> (ELI LILLY AND COMPANY)  * Ansprüche; Seite 1, Zeile 35 - Seite 2, Zeile 20 *  --	1,12-15,19,22	
A	<u>FR - A1 - 2 511 867</u> (ELI LILLY AND COMPANY)  * Ansprüche; Seite 2, Zeile 26 - Seite 5, Zeile 32 *  --	1,12-15,19,22	
A,P	<u>EP - A1 - 0 092 280</u> (AKZO N.V.)  * Ansprüche *  ----		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.) 4
			A 61 K 37/00
<b>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</b>			
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-22          Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 23          Nicht recherchierte Patentansprüche: 23</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (Artikel 52(4) EPÜ)</p>			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 29-10-1984	
		Prüfer STÖCKLMAYER	
<p><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b></p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet          Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie          A : technologischer Hintergrund          O : mündliche Offenbarung          P : Zwischenliteratur          T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist          D : in der Anmeldung angeführtes Dokument          L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</p> <p>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

**DELPHION****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**
[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)
[My Account](#)
 Search: [Quick/Number](#) [Boolean](#) [Advanced](#) [Derwent](#) [He](#)

## The Delphion Integrated View

 Get Now: [PDF](#) | [File History](#) | [Other choices](#)

 Tools: [Add to Work File](#) [Create new Work File](#) [Ad](#)
 View: [Expand Details](#) | [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#)

 Go to: [Derwent](#)
[Email this to a frien](#)

🔍 Title: **EP0132769A1: Pharmaceutical formulation for the treatment of diabetes mellitus**  
[German](#) [French](#)

🔍 Derwent Title: Compsn. contg. insulin deriv. with basic residue in B chain - and natural insulin, for slow release treatment of diabetes [Derwent Record](#)

🔍 Country: **EP** European Patent Office (EPO)

🔍 Kind: **A1** Publ. of Application with search report <sup>1</sup> (See also: [EP0132769B1](#) )

🔍 Inventor: **Grau, Ulrich, Dr.;**

🔍 Assignee: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**

🔍 Corporate Tree data: [SanofiAventis \( SANOFIAVENTIS \)](#); [Aventis SA \( AVENTIS \)](#); [Hoechst AG \( HOECHSTAG \)](#)  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

🔍 Published / Filed: **1985-02-13 / 1984-07-18**

🔍 Application Number: **EP1984000108441**

🔍 IPC Code: Advanced: [C07K 14/62](#); [C07K 14/625](#); [A61K 38/00](#);  
 Core: [C07K 14/435](#); [more...](#)  
 IPC-7: [A61K 37/26](#);

🔍 Priority Number: 1983-07-22 **DE1983003326473**

🔍 Abstract: The invention relates to medicaments consisting of a physiologically acceptable excipient and an active compound combination of (a) an insulin derivative of the formula I (I) in which R1 denotes H or H-Phe, R30 represents the radical of a neutral L-aminoacid and R31 represents a physiologically acceptable organic group of basic character with up to 50 carbon atoms, with an isoelectric point between 5.8 and 8.5, and (b) an insulin of the formula I in which R1 denotes H or H-Phe, R30 represents Ala, Thr or Ser and R31 denotes OH, and to its use for the treatment of diabetes mellitus.

🔍 INPADOC [Show legal status actions](#) [Get Now: Family Legal Status Report](#)

Legal Status: [AT](#) [BE](#) [CH](#) [DE](#) [FR](#) [GB](#) [IT](#) [LI](#) [LU](#) [NL](#) [SE](#)

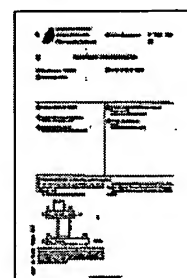
🔍 Designated Country:

🔍 Family: [Show 71 known family members](#)





🔍 Forward [Go to Result Set: Forward references \(7\)](#)

References:

PDF	Patent	Pub.Date	Inventor	Assignee	Title
	<a href="#">US6610649</a>	2003-08-26	Wahren; John	Creative Peptides Sweden AB	<a href="#">Insulin C-peptides</a>
	<a href="#">US6004938</a>	1999-12-21	Frick; Wendelin	Hoescht Aktiengesellschaft	<a href="#">Inositolglycans having insulin-like action</a>
			Muller;	Heochst	<a href="#">Phosphoinositol-glycan-peptide</a>


[High Resolut](#)
[Low Resolution](#)

36 page

	<a href="#">US5624903</a>	1997-04-29	Gunter	Aktiengesellschaft	<a href="#">with insulin-like action</a>
	<a href="#">US5622934</a>	1997-04-22	Frick; Wendelin	Hoechst Aktiengesellschaft	<a href="#">Peptides with an insulin-like action</a>
	<a href="#">US5177058</a>	1993-01-05	Dorschug; Michael	Hoechst Aktiengesellschaft	<a href="#">Pharmaceutical formulation for the treatment of diabetes mellitus</a>
	<a href="#">US5149716</a>	1992-09-22	Vertesy; Laszlo	Hoechst Aktiengesellschaft	<a href="#">Insulin derivatives, process for their preparation, their use and a pharmaceutical preparation containing them</a>
	<a href="#">US5028587</a>	1991-07-02	Dorschug; Michael	Hoechst Aktiengesellschaft	<a href="#">Mixed crystals of insulin and insulin derivatives</a>

Other Abstract  
Info:

None



[Nominate this for the Gallery...](#)

THOMSON

Copyright © 1997-2006 The Thomson Corpora

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS.

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**